

* NOTICES *

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Cell immobilization / preservation liquid which consists of the buffer solution containing either ethyl alcohol, salt, **** or propylene glycol.

[Claim 2] Cell immobilization / preservation liquid given in the 1st term of a patent claim characterized by the buffer solution being a phosphate buffer.

[Claim 3] Cell immobilization / preservation liquid given in the 2nd term of a patent claim characterized by for the concentration of 2% and propylene glycol being [the concentration of ethyl alcohol / for the concentration of 0.8 - 0.9% and ****] 1.5 - 2% for the concentration of 30 - 40%, and salt, and the phosphate concentration of a phosphate buffer being 0.01 mols.

[Claim 4] Cell immobilization / preservation liquid which consists of the buffer solution containing ethyl alcohol, salt, ****, or either of the propylene glycols and the methyl cystine as a mucolytic agent.

[Claim 5] Cell immobilization / preservation liquid given in the 4th term of a patent claim characterized by the buffer solution being a phosphate buffer.

[Claim 6] Cell immobilization / preservation liquid given in the 5th term of a patent claim characterized by for the concentration of 1.5 - 2% and a methyl cystine being [the concentration of ethyl alcohol / the concentration of 30 - 40%, and salt / for the concentration of 2% and propylene glycol] 0.1 - 0.2% for the concentration of 0.8 - 0.9%, and ****, and the phosphate concentration of a phosphate buffer being 0.01 mols.

[Claim 7] Cell immobilization / preservation liquid given in the 4th term of a patent claim characterized by furthermore containing a silicon nature defoaming agent.

[Claim 8] Cell immobilization / preservation liquid given in the 7th term of a patent claim characterized by the content of a silicon nature defoaming agent being 30-50 ppm.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-46100

(24) (44) 公告日 平成 7 年 (1995) 5 月 17 日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48	P			
33/50	X			

発明の数 2 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願昭61-311818	(71) 出願人	999999999 高浜 素秀 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医 科大学第二病理学教室内
(22) 出願日	昭和61年(1986)12月30日	(71) 出願人	999999999 丸木 清美 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医 科大学理事長室内
(65) 公開番号	特開昭63-168562	(72) 発明者	高浜 素秀 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医 科大学第二病理学教室内
(43) 公開日	昭和63年(1988) 7 月 12 日	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔
		審査官	吉田 禎治
		(56) 参考文献	特開 昭62-217158 (J P, A) 特開 昭61-80046 (J P, A) 特公 昭49-16609 (J P, B 1)

(54) 【発明の名称】 細胞固定・保存液

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エチルアルコールと食塩と蔗糖又はプロピレングリコールのいずれか一方とを含有する緩衝液から成る細胞固定・保存液。

【請求項 2】 緩衝液が磷酸緩衝液であることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載の細胞固定・保存液。

【請求項 3】 エチルアルコールの濃度が 30～40%、食塩の濃度が 0.8～0.9%、蔗糖の濃度が 2%、プロピレングリコールの濃度が 1.5～2% であり、磷酸緩衝液の磷酸塩濃度が 0.01 モルであることを特徴とする特許請求の範囲第 2 項記載の細胞固定・保存液。

【請求項 4】 エチルアルコールと食塩と蔗糖又はプロピレングリコールのいずれか一方と粘液溶解剤としてのメチルシステインとを含有する緩衝液から成る細胞固定・保存液。

2

【請求項 5】 緩衝液が磷酸緩衝液であることを特徴とする特許請求の範囲第 4 項記載の細胞固定・保存液。

【請求項 6】 エチルアルコールの濃度が 30～40%、食塩の濃度が 0.8～0.9%、蔗糖の濃度が 2%、プロピレングリコールの濃度が 1.5～2%、メチルシステインの濃度が 0.1～0.2% であり、磷酸緩衝液の磷酸塩濃度が 0.01 モルであることを特徴とする特許請求の範囲第 5 項記載の細胞固定・保存液。

【請求項 7】 さらにシリコン性消泡剤を含有することを特徴とする特許請求の範囲第 4 項記載の細胞固定・保存液。

【請求項 8】 シリコン性消泡剤の含有量が 30～50ppm であることを特徴とする特許請求の範囲第 7 項記載の細胞固定・保存液。

【発明の詳細な説明】

〔産業上の利用分野〕

本発明は細胞診検体の固定に適した細胞固定液に関し、細胞の核と細胞質を良好な形態に固定し、さらにその形態をかなりの期間保存しうるものである。

〔従来の技術〕

喀痰や子宮頸部から綿棒で採取された粘液性の検体中には無数の細胞が含まれており、その中に前癌状態の異型細胞や癌細胞が含まれていないかどうかを検査するのが細胞診であり、この細胞診は、現代の癌の早期発見に重要な役割を担っている。この細胞診には顕微鏡が用いられてきたが、近年はそれに加えて、細胞を秒速数百個またはそれ以上のスピードで流して測定するところの自動細胞分析・分離装置であるフローサイトメトリー (flow cytometry) を用いて行う自動化細胞診も適用されようとしている。顕微鏡あるいはフローサイトメトリーを用いた細胞診のいずれの場合でも、細胞が正確に診断されるためには、検体中の細胞が良好な状態に固定されることが極めて重要で、固定が不良な場合は、癌細胞が見落とされたり、逆に癌細胞でないものが癌細胞と見誤れたりする。

細胞診の一般的な固定法は、検体をスライドガラスに直接塗抹してそれが乾かぬうちに迅速に固定液に入れて固定する方法 (塗抹標本の湿潤固定法) がとられ、その固定液としては95%エタノールが用いられる。しかし、入院していない患者や集団検診の被検者について肺癌の喀痰細胞診を行う場合は、病院を受信した際に直ちに痰が喀出できるとは限らない。むしろ痰は起床時に出やすく、またこの起床時の痰は、就寝中に肺内から遊離した細胞を豊かに蓄えているので細胞診に最も適している。この起床時の痰を病院に持参した後に固定を行うのでは時間が経ち過ぎ、細胞に変性が加わっていて固定が不良であり、細胞診が不正確となる。このような場合、適切な喀痰用の細胞固定液があって細胞を直ちに固定できれば、起床時の喀痰を自宅でその固定液に入れて保存し、後日病院へ持参出来るので好都合である。しかし、喀痰を95%エタノール固定液に入れると、喀痰の粘液が表層から凝固し、凝固した表層は、固定液が内部へ浸透するのを妨害して内部の細胞の固定を不良とするばかりでなく、喀痰をスライドガラスに薄く延ばして塗抹することをも妨げて更に標本の質を悪くする。また、フローサイトメトリーによる自動化細胞診の場合には、細胞の固定状態が不均一なために測定誤差が大きくなったり、凝固した粘液塊が装置のノズルを詰らせて分析不能となるなどの重大な支障を生ずる。

肺癌検診のために、喀痰用の固定液を最初に導入したのは米国のサコマンノ (Saccomanno, 1963) であり、我が国においても、このサコマンノ液がしばしば用いられている。このサコマンノ液は、50%エタノール水にカーボワックス (ポリエチレングリコール1540) が2%の割合に添加された簡単な組成のものである。この液の中に喀痰を

吐き出して一定時間固定したあと、検査室においてプレnderにかけて強く攪拌して粘液を機械的に破壊して細胞を遊離させ、遊離した細胞を遠心沈澱して収集し、これをスライドガラスに塗抹して塗抹標本を作り、染色を施して顕微鏡診断を行うことになる。この液は、エタノール濃度が50%と少し高い上にカーボワックスを含むため、固定中に細胞の収縮や核の濃縮が起り、そのため細胞の詳細な内部構造が読み取り難く、慣れないと細胞診断に支障を来す欠点がある。また、フローサイトメトリーによる自動化細胞診においては、この液が粘液溶解剤を含まないために、溶けずに残っている粘液が装置のノズルを詰らせて測定が不能となったり、また細胞集塊が生じ易いために、細胞一個一個の測定が不能となるなどの重大な支障をきたす。従って、このサコマンノ液は、フローサイトメトリーによる自動化細胞診にとっては特に不適切な固定液である。

近年、我が国において、粘液溶解性の核痰用固定液が開発されて市販されるようになったが、これらはいずれもサコマンノ液と同様に2%のカーボンワックスを含む50%エタノール水を基本とし、粘液溶解剤を添加したものである。粘液溶解剤として、東北大学抗酸菌研究所式 (サーマル社発売) はNアセチル-Lシスチン (N-acetyl-L-cysteine) を用い、大阪府成人病センター式 (松浪ガラス社発売) はジチオトレイトール (dithiothreitol) を用い、またY式核痰固定液 (武藤純葉社製、特許出願中とのこと) はジハイドロキシジチオールブタン (dihydroxy dithiolbutan) や酵素を加えたものとされている。

〔本発明が解決しようとする問題点〕

近年、肺癌患者の急増に関連して喀痰細胞診への需要も急増し、老人医療法の改正によって昭和62年度から成人の肺癌検診が義務付けられることになると、喀痰細胞診への需要増加にさらに拍車がかかる情勢である。しかし、肺癌検診のための喀痰細胞診は、子宮癌検診の細胞診に比べて、正常細胞の数が著しく多くて異常細胞の含有率は少ない特徴のために、顕微鏡による診断は著しく労力がかかる作業である上、この技術に習熟した細胞診士や指導医の数も少ない。そこで労力節減のため、近年は、フローサイトメトリーを用いた自動化細胞診の開発が強力に推進されている。これは、バラバラにした細胞を蛍光染色して溶液中に浮遊させておき、この細胞を装置の中を高速で流しながらレーザー光線を当てて蛍光を発生させ、細胞一個ずつからの蛍光量を測定して細胞を定量するものであるから、喀痰などの粘液性の検体の場合はその粘液を溶解し、細胞を分散した浮遊状態として固定 (浮遊固定) し得る固定液が不可欠である。また、集団検診において多数被検者の喀痰をそれぞれ固定液に入れて回収する場合は、通常は数日間は固定液に入れたまま保存されることが多いので、この間に細胞の変性が進行する危険もある。そのような場合に、細胞の固定性

と共に細胞構造の保存性も良好な固定・保存液が望まれる。そのような液があれば、肺癌の集団検診にも便利に利用出来るし、また子宮癌についての集団検診においても、検診医は、綿棒を一つその場でスライドグラスに塗抹をせずとも、綿棒を固定液に投入しておけばよいので手間を省け、かつ塗抹時に起り易い塗抹標本の乾燥という重大な障害からも逃れることが出来て好都合である。細胞の固定・保存性の良否は細胞の診断精度に重大な影響を及ぼし、これが不良の検体では診断が不能となったり、誤診が生じたりするので、細胞診を担当する関係者には非常に関心が高い。このような細胞の固定・保存液に関して要求される事項を纏めると以下の通りである。

1. 粘液溶解性：

検体中の粘液は、一般に固定液に触れると凝固し、凝固した粘液は、固定液の粘液塊内浸透を阻害して細胞の固定を不均等として細胞分析上の誤差を生み、また粘液塊がフローサイトメトリーのノズルを詰らせて分析を不能とする。従って、粘液性の強い検体の場合、固定中に粘液が溶解される固定液が望まれる。

2. DNAと蛋白質の固定：

顕微鏡による診断に際しては、核の大きさやその内部構造、および核／細胞質比が診断の対象となり、またフローサイトメトリーによる自動化細胞診に際しては、核のDNA量および細胞のDNA量／蛋白量が定量の対象となるので、核（DNA）と細胞質（蛋白質）との両者が共に良く固定され、かつ保存されなければならない。

3. 固定による細胞の収縮や凝集の防止：

細胞の固定は確実でなければならないが、固定を強化すると、細胞が収縮あるいは濃縮して顕微鏡的診断が困難になったり、また細胞同士が凝集して細胞集塊を作り、これがフローサイトメトリーのノズルを詰らせて測定が不能になったりするので、固定の強度はほどほどでなければならない。

4. 固定液の毒性：

肺癌の集団検診の際は、喀痰の固定液を容器に入れて被検者に配布することになるが、家庭に配布された固定液を誤って子供などが飲むという万一の事故も考慮すると、その固定液の毒性は低くなければならない。

5. 固定した細胞の保存性：

集団検診の際は、大量が検体の一時に集められ、これらが順次検査されるので、その間の数日から2週間ぐらいは固定液の中で細胞構造が保存されねばならない。近年わが国で市販されている各種の喀痰固定液を検討したが、0.2%アセチルシスチンを50%エタノール水に添加した東北大学抗酸菌研究所式の固定液は、追試の結果、粘液溶解性は良好であるが、本出願者がフローサイトメトリーによる自動化細胞診用に開発したDNA蛋白同時定量用蛍光染色液の成分であるヘマトポルフィリンとアセチルシスチンとが反応を起して褐色の絮状沈澱物を生じ、該染色液による染色が傷害されることが欠点で

あった。次にジハイドロキシ ジチオールブタンを用いたYM喀痰固定液（武藤純薬株式会社製、特許出願中）を検討したが、これは粘液溶解性の点ではNアセチルシスチン使用の固定液と同等と思われたが、独特の悪臭があり、痰を吐きだそうとして口を容器に近づけると、卵が腐ったような悪臭が鼻をつく。ある地域の集団検診で、これを配られた被検者のうちには、この固定液の悪臭から固定液が腐っていると思い、固定液を捨てたものがいたとする報告も伝えられた。またジハイドロキシ ジチオールブタンの毒性が不明な点、酵素を用いているので約3カ月の有効期間しかなく高価であるなどの点にも問題がある。ジチオトレイトールを用いた大阪成人病センター式の喀痰固定液については今回は実験していないが、ジチオトレイトールはNアセチルシスチン同様に去痰剤として用いられる薬物であり、使用量も少ないので毒性面では問題がないものと思われるが、高価である点、価格面での問題がある。

本発明は、上述のような欠点がなく、喀痰等の細胞診検体の固定において、細胞の核と細胞質を良好な形態に固定し、更にその形態をかなりの期間維持しうる固定・保存液を提供することを目的とし、さらに、フローサイトメトリーと細胞蛍光染色法とを用いた自動化細胞診にも適した固定・保存液を提供することを目的とする。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的は、エチルアルコールと食塩と蔗糖又はプロピレングリコールのいずれか一方とを含有する緩衝液を細胞の固定及び保存に用いることにより達成される。さらに、粘液性の細胞診検体の固定・保存には、上記緩衝液に粘液溶解剤として本発明者が見出した新規な粘液溶解剤メチルシスチンを加えた固定・保存液を用いれば粘液が良く溶け、細胞の核及び細胞質が良好に固定され、しかもフローサイトメトリーと細胞蛍光染色法を用いた自動化細胞診にも適する。

以下に固定・保存液に要求される性質と関連して各成分の説明を行う。

1) 粘液溶解性の問題

本発明者は、フローサイトメトリーと細胞の蛍光染色による細胞診の自動化を開発している途上に、当該染色板と反応しない粘液溶解剤を種々検討した結果、メチルシスチンを見出した。メチルシスチンは塩酸塩は、化学的には $\text{methyl}\beta\text{-mercaptoalanine hydrochloride}$, $\text{HS-CH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{COO-CH}_3\cdot\text{HCl}$ であり、かつては去痰剤として用いられたことがある。多数の患者の喀痰を用いて検討の結果、固定液にメチルシスチンを0.1~0.2%添加したもので、粘液がよく溶け、細胞固定効果も良好で、固定液に時に悪臭もなく、また長期の保存にも変質や効力減退を示さなかった。

なお、粘液性の少ない検体の細胞固定には、粘液溶解剤を用いる必要はなく、以下に述べる各成分を含む緩衝液を用いれば十分である。

また、フローサイトメトリーによる分析の際には、粘液溶解と細胞分散の目的で、検体を入れた固定液を高速ブレンダーで激しく振盪するが、その際に無数の細かな気泡が生じ、これが粘液塊を覆ったり粘液塊の中にとじこめられたりして粘液と粘液溶解剤との接触を妨害するので、シリコンレジン製剤であるアンチフォームを消泡剤として加え、良い結果を得た。シリコンレジンは消泡剤として、ビール、ブドー酒、しょうゆ、乳製品、果物ジュースなどの各種の食品の濃縮、発酵、および蒸溜工程などに用いられ、作業の能率化や製品の均一化などに役立っており、食品中の本品の残留量は50ppm以上と定められている。実験の結果、シリコンレジンの消泡作用は10ppmで十分に発現し、30ppm以上ではシリコンレジンの不溶解分が残るので無駄であった。

2) 核(DNA)と細胞質(蛋白質)の固定の問題

後述のように、固定液の主剤として適したエタノールは、粘液を凝固させたり細胞を凝集させたりする点から濃度が低い方がよい。しかし、固定液のエタノールの濃度を低くした場合は、エタノールの固定効果が減弱するのでそれを補強しなければならない。固定剤としてはグルタルアルデヒドやホルマリンなど種々あるものの、集団検診用の固定液に課せられる安全性を考慮にいれると、そのような毒性の強いものは使用できない。

まず核の固定であるが、核の主成分はDNAであり、低濃度エタノールによる固定ではDNAが完全に凝固せず一部が可溶性となって消失する。一方、DNAは生理的濃度の食塩の存在下でその溶解度を最も減ずるので、この性質を利用して、固定液に食塩を生理的濃度に加えることによってDNA溶解度を最低とし、エタノールによるDNAの固定を補強した。食塩の濃度は0.8~0.9%が好ましい。

次に細胞質の固定であるが、細胞質の蛋白質を凝固固定する物質はエタノールの他に数多くあるが、これらの固定剤は粘液をも凝固するので向きである。また、細胞質が完全に凝固固定された細胞は、恰もゆで卵のように丸く硬化し、スライドガラスの上に貼りつきにくく、染色の操作中にスライドガラスから脱落し易い。もし、癌細胞が脱落すると、それは癌の偽陰性誤診(false negative diagnosis)という重大な失敗をおかすことになる。また、細胞が、めだま焼き卵のようにスライドガラス上に薄く延ばされた時には、その核や細胞質の内部構造が顕微鏡で明瞭に観察できて診断が容易であるが、蛋白が強く凝固されてゆで卵のように丸く硬化した場合は観察しがたく診断も難しくなる。従って、細胞固定は、細胞がその本来の軟らかさが或る程度残って固定され、細胞がスライドガラスに塗抹された際に薄く伸ばし得ることが必要であり、30-40%の低濃度エタノールはそのような軟らかな固定に適している。しかし、このような低濃度エタノール中では、水分が細胞内に流入して細胞は膨化する。この水分流入を防止する最も簡単な方法は細胞から脱水をすることであり、そのための単純な物質

としては蔗糖、グリセリン、あるいはプロピレングリコールなどがある。そのうち蔗糖は、安価で毒性はなく、また寒冷や高温からの細胞底護作用や、顕微鏡標本を作る際に乾燥防止の作用もあるところから推奨される物質である。蔗糖を固定液に添加する場合の適正濃度は、実験の結果は2%であった。また蔗糖をプロピレングリコールで置き換えても効果は同等であった。プロピレングリコールの濃度は1.5~2%が好ましい。

3) 細胞の収縮と凝集の防止の問題

細胞固定のための主剤としてのエタノールは、毒性が低い点からも優れた固定剤であるが、サコマノ液ならびに我が国で用いられている前記の3種類の粘液溶解性の固定液はいずれもエタノール濃度が50%であり、この濃度では粘液の凝固や細胞の凝集が起きやすい。従って、喀痰の適切な固定のためには、エタノールの濃度をさらに低くすると共に、固定効果をエタノール以外の物質でも補強するのが望ましい。適正なエタノール濃度に関しては、本発明者らは、エールリッヒ腹水癌細胞を各種の濃度のエタノール水に入れて放置した後に、顕微鏡で細胞形態を観察する実験により、エタノール濃度は30-40%が良いと結論した。

4) 固定液の毒性の問題

粘液溶解剤のメチルシスチンは、去痰剤としても用いられる薬物であり、本固定液に用いられる量はごく僅かなので毒性面からは問題にならない。また、エタノールの濃度はホワイトリッカーやウイスキーと同等の30-40%であり、その毒性は少なくとも50%エタノールによるものよりは軽い。そのほかの成分は磷酸緩衝液、食塩、蔗糖および、食品添加物としての許容濃度内のプロピレングリコールとシリコンレジンであり、いずれも毒性の心配はない。

5) 細胞の保存性

固定した細胞の保存のためには緩衝液とすることが必要であり、磷酸緩衝液が一般的であるが、これに限定されない。

6) 本固定液の調合法

上記の検討の結果、必要な諸成分を含む本固定液の調合法の一例としては、0.8~0.9%の食塩を含む0.01モル磷酸緩衝液(0.01モル磷酸緩衝生理的食塩水、phosphate buffered saline solution)(以下、PBSと略称)に、メチルシスチンを0.2%、蔗糖もしくはプロピレングリコールを2%、水溶性アンチフォームを10ppm、エタノールを40%、それぞれ最終濃度になるように加えればよい。

7) 本固定液の使用法

本発明の固定液の具体的な使用法としては肺癌検診においては、喀痰を吐き出すための専用の容器に本固定液を入れて喀痰用固定液として製品化しておき、これを予め被検者に1-3本ずつ配布しておいて起床時の痰を喀出させ、それを容器ごと後日巡回して回収するか、または

郵送などの方法で回収し、また、子宮癌検診においては、綿棒がそのまま投入できる専用の容器に本固定液を入れたものを子宮癌検診用固定液として製品化しておき、これに検診医が被検者の子宮腔部を擦過した綿棒を投入させ、回収する。回収した固定液を検査室に運び、そこで遠心沈澱して細胞を収集し、その塗抹標本につき顕微鏡診断を行うか、あるいは細胞浮遊液を作ってフローサイトメトリーによる自動化細胞診を行うことになる。

例えば、喀痰の固定の場合、喀痰を本固定液中に吐き出したあと、手でよく振盪しておく。2日～1週間の固定の後、高速ブレンダーで約2分間振盪し、遠心沈澱し、顕微鏡標本作成の場合は、残渣をビベットでスライドガラスに移し、一昼夜乾燥した後、95%エタノールまたはスプレー式による再固定を行う。フローサイトメトリーによる自動化細胞診の場合は、残渣を1回磷酸緩衝液で洗浄したのち、蛍光染色を施して分析に供する。

【実施例】

実験例

1) 固定液中のエタノール濃度の低濃度の限界を定める実験

エタノールの50、40、30、20%水溶液、および対照液としてサコマノ液（エタノール濃度は50%）を準備し、各溶液に一定数のエールリッヒ腹水癌細胞を入れて室温に一昼夜放置し、自動遠沈塗抹装置（オートスメア）により塗抹標本作製し、ババニコロー染色を施して顕微鏡観察を行った。

【結果】 エタノール濃度が50%のものとサコマノ液に固定したエールリッヒ腹水癌細胞は、エタノール濃度が50%と濃いため、細胞凝集や細胞収縮の傾向が見られ（第1図）、20%のものでは細胞の膨化が見られ、40%および30%のものではそのような現象は見られなかった。

2) 30%エタノール水に添加する食塩の濃度の適正値を定める実験

食塩はDNAの溶解を抑制するので、その濃度の適正値を知るため、40%エタノール水に食塩をそれぞれ、0、0.2、0.4、0.6、0.8%添加したものを準備し、これにエールリッヒ腹水癌細胞を室温で一昼夜固定し、塗抹標本作製し、ババニコロー染色を施して顕微鏡で観察するとともに、一部の細胞を電子顕微鏡で観察した。

【結果】 食塩濃度が0、0.2および0.4%のものでは、0.8%のものに比べて核の染色性がうすく、0.6%ではその中間であった。また電子顕微鏡（2000倍）では核の内部構造が0.8%のものではよく保たれていた（第2図）。

3) 0.8%食塩添加の30%エタノール水にさらに添加する蔗糖の濃度の適正値を定める実験

蔗糖は細胞に流入する水分を制限して蛋白の固定を促進するので、0.8%食塩を添加した30%エタノールに、蔗

糖をそれぞれ0、2、4、6、8%添加したものを準備し、これにエールリッヒ腹水癌細胞を室温で一昼夜固定し、塗抹標本作製し、ババニコロー染色を施して顕微鏡で観察した。

【結果】 蔗糖濃度が0%のものでは細胞質が膨化しており、8%のものでは最も収縮しており（第3図）、6および4%でも多少収縮しており、2%のものが膨化も収縮も見られず、もっともよい細胞形態を示した（第4図）。細胞も核もほどよく拡がり、第3図と比較すると核の内部構造が明瞭に読み取れる。

4) 0.8%食塩ならびに2%蔗糖を添加した30%エタノールの溶媒としてのPBSのモル濃度を定める実験
磷酸緩衝生理的食塩水（PBS）液は、蒸留水より細胞保存の作用が優れているのでこれを固定液の溶媒として用いることとし、固定液にいた検体を冷蔵庫保存する際の磷酸塩の結晶析出のない濃度を検討した。

【結果】 実験に用いられることが多い0.06モル濃度のPBS溶媒とした場合は、これに喀痰を入れた場合も入れない場合も、冷蔵庫中で冷やすと直ちに板状結晶が析出し、この結晶は液を常温に戻しても溶解しなかった。しかし、0.01モル濃度のPBSを溶媒として用いた固定液では、数カ月間冷蔵庫中で保存しても結晶の析出は見られなかった。

5) 喀痰の年液溶解剤のメチルシステインの濃度を定める実験

喀痰の粘液溶解のために固定液に添加する粘液溶解剤のメチルシステインの適正濃度を知るため、30%エタノール・PBSに、メチルシステインを0、0.5、0.1、0.2、0.5%それぞれ添加したものを準備し、これに患者の喀痰を入れ、室温で3日間放置したものを手で約20秒間振盪し、粘液の溶解性を目で観察した。

【結果】 メチルシステインの濃度が0および0.05%のものでは粘液の溶解は不十分で（第5図）、0.1%以上の濃度で粘液溶解が発現した（第6図）。

第6図の写真はメチルシステインを添加しない固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）である。

画面の下1/3に横に走る線条は粘液で、これに細胞がからめられていて、分散していない。

第7図の写真はメチルシステインを0.2%添加した固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）である。

粘液が溶解して、細胞は良く分散している。ひときわ大型の細胞は肺癌細胞である。

6) 固定液の消泡剤として添加するシリコン製剤の効果を見る実験

固定液に固定した喀痰は、その粘液溶解と細胞分散の目的のため、容器ごと高速ブレンダーにかけて毎分約6000回の振動を与えるが、この際に固定液が強く泡立ち、この気泡が喀痰の周囲を取り巻き、固定液との接触

を妨害する。そこでシリコン製剤の消泡剤を用いることとし、その商品であるアンチフォームを食品添加剤として認可されている濃度の10ppm添加した固定液（2%蔗糖を添加した30%エタノール・PBS）と、アンチフォームを添加してない固定液と準備し、これらに喀痰を入れて高速ブレンダーにより2分間振盪したところ、アンチフォームを添加したものが明らかに気泡の発生が少なく、また消泡も早く、粘液溶解も優れていた。

7) 細胞の乾燥防止のために添加するプロピレングリコールの実際の効果にみる実験

喀痰の固定液による固定後は、これをスライドガラスに塗抹して、染色に移る前に一晩乾燥するのであるが、その際に細胞が乾燥しすぎると染色性が悪くなるので、それを防止するため、プロピレングリコールの湿潤作用の効果も調べたところ、プロピレングリコールが添加してあるものの染色性のほうが、これを添加してないものより優れていた。尚、プロピレングリコールの濃度は1.5～2%が適当であり、この濃度は食品添加物としての許容濃度である3%以内であるので、固定液の毒性面からも問題とならない。

実施例

固定液（0.2%メチルシスチン、0.8%食塩、2%プロピレングリコールおよび10ppmアンチフォームを添加した40%エタノール・PBS）（固定液に喀痰を吐き出すと、唾液が加わって固定液のエタノール濃度が薄まるので、エタノール濃度は40%とした）の喀痰の粘液溶解性、細胞凝集性および細胞固定効果をみる実験：

完成した固定液の総合的な効果をみるため、126名の患者の喀痰につき、喀痰を入れた直後にこれを手で振盪した時と3日後に高速ブレンダーで振盪した場合の喀痰溶解性、細胞の分散および固定効果などを検討した。（表1）

〔結果〕 高速ブレンダーで振盪後は、1例の喀痰を除き、粘液溶解が認められた。粘液溶解が不能であった1例は、高度に血性であったために血液が粘液をまき込んで凝固したものであった。

表1 完成した本固定溶液で
固定した126例の喀痰
の溶解性の記録。

	容器を手で振盪	容器を高速ブレンダー振盪
完全溶解	98(78%)	119(94%)
不完全溶解	26(21%)	6(5%)
溶解しない	2(1%)	1(1%)

また、顕微鏡所見上、細胞の分散は良好で、細胞質および核の構造は1カ月以上保存したものでも優れていた。第7図～第10図の写真は完成した本固定液で固定し、40日間冷蔵庫で保存された喀痰中の肺癌細胞の顕微鏡写真（400倍）である。細胞質も核もその構造が極めてよく保たれている。第7図と第8図は肺の扁平上皮癌細胞の写真で、第9図と第10図は肺の腺癌細胞の写真である。

〔発明の効果〕

以上説明したように、本発明の固定・保存液を用いれば、細胞の収縮や凝集がみられず、細胞の核及び細胞質の構造を良好な形態に固定でき、また固定された細胞の保存性にもすぐれているので、喀痰等の細胞診検体の固定に適し、特に肺癌検診の際の喀痰の固定・保存液として利用価値が高い。さらに、粘液溶解剤としてメチルシスチンを加えれば粘液を溶解して細胞を分散させ、細胞固定効果も良好であり、しかもこれは蛍光染色液と反応しないため、フローサイトメトリーと細胞蛍光染色法とを用いた自動化細胞診にも適する固定・保存液を提供しうる。

20 【図面の簡単な説明】

第1図はサコマン液で固定したエールリッヒ腹水癌細胞の顕微鏡写真。

第2図は0.8%食塩添加の30%エタノール水で固定したエールリッヒ腹水癌細胞の核の電子顕微鏡写真（2,000倍）。

第3図は0.8%食塩添加の30%エタノール水に更に8%の蔗糖を添加した液で固定したエールリッヒ腹水癌細胞の顕微鏡写真。

30 第4図は0.8%食塩添加の30%エタノール水に更に2%の蔗糖を添加した液で固定したエールリッヒ腹水癌細胞の顕微鏡写真。

第5図はメチルシスチンを添加しない固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）。

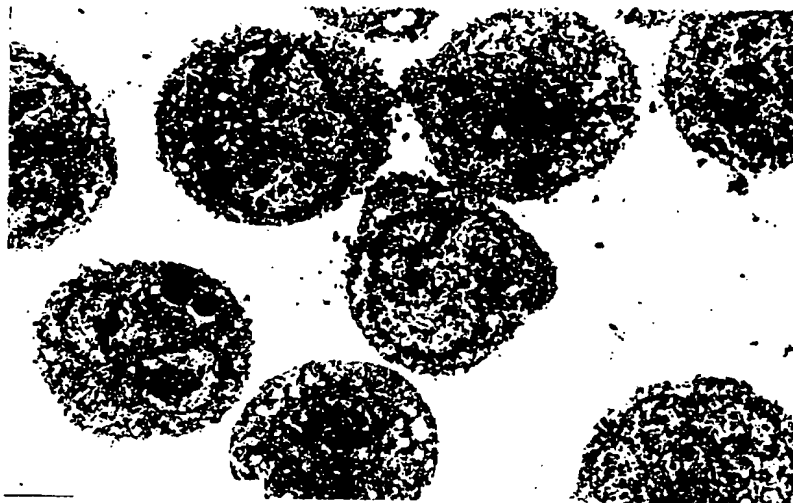
第6図はメチルシスチンを0.2%添加した固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）。

40 第7図～第10図は、本発明固定液で固定し、40日間冷蔵庫で保存された喀痰中の肺癌細胞の顕微鏡写真（400倍）。第7図と第8図は肺の扁平上皮癌細胞の写真で、第9図と第10図は肺の腺癌細胞の写真。

【第1図】



【第2図】



【第3図】

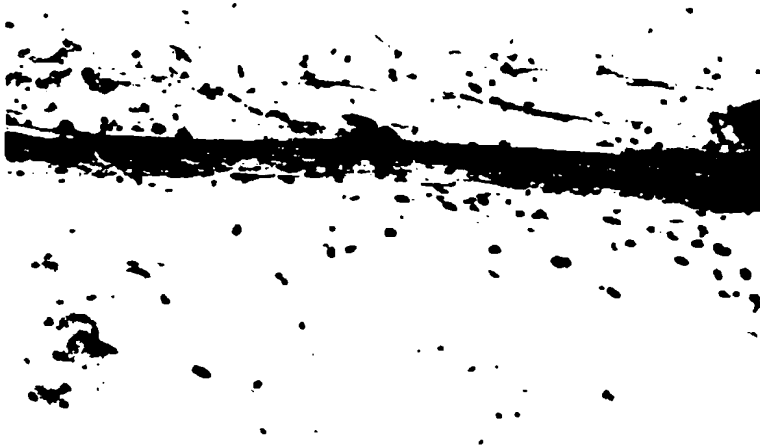


BEST AVAILABLE COPY

【第4図】



【第5図】



【第6図】



BEST AVAILABLE COPY

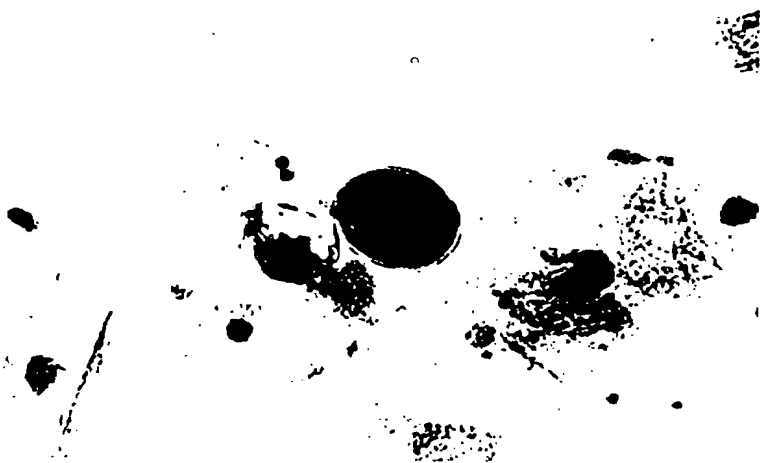
(9)

特公平7-46100

【第7図】



【第8図】



【第9図】



(10)

特公平7-46100

【第10図】



BEST AVAILABLE COPY